

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/02582 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H 15/203, A61K 31/7028, A61P 35/00

(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler,
Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02337

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmelde datum:
28. Juni 2001 (28.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 31 955.6 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM, STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CURCUMIN DERIVATIVES WITH IMPROVED WATER SOLUBILITY COMPARED TO CURCUMIN AND MEDICAMENTS CONTAINING THE SAME

A1 (54) Bezeichnung: CURCUMIN-DERIVATE MIT GEGENÜBER CURCUMIN VERBESSERTER WASSERLÖSLICHKEIT UND DIESE ENTHALTENDE ARZNEIMITTEL

(57) Abstract: The invention relates to curcumin derivatives with improved water solubility compared to curcumin, characterized in that the curcumin part is linked to a mono, oligo or polysaccharide. The invention also relates to medicaments containing these derivatives. The inventive curcumin derivatives are particularly suitable for use for preventing and treating cancer, chronic-inflammatory diseases and diseases associated with a retrovirus infection.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Curcumin-Derivate mit gegenüber Curcumin verbesserter Wasserlöslichkeit, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Curcumin-Anteil mit einem Mono-, Oligo- oder Polysaccharid verknüpft ist, sowie diese Derivate enthaltende Arzneimittel. Die erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate sind besonders zur Prävention und Behandlung von Krebs-, von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und von mit einer Retrovirus-Infektion einhergehenden Erkrankung geeignet.

WO 02/02582

Curcumin-Derivate mit gegenüber Curcumin verbesserter Wasserlöslichkeit und diese enthaltende Arzneimittel

Die vorliegende Erfindung betrifft Curcumin-Derivate mit gegenüber Curcumin verbesserter Wasserlöslichkeit, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Curcumin-Anteil mit einem Saccharid verknüpft ist, sowie diese Derivate enthaltende Arzneimittel. Die erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate sind besonders zur Prävention und Behandlung von Krebs, vorzugsweise von EBV-assoziierten Tumoren und Transplantations-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen, von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und von mit einer Retrovirus-Infektion einhergehenden Erkrankung geeignet.

Curcumin (1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion; Enol-Form) ist der Farbstoff der Gelbwurzgewächse, beispielsweise von *Curcuma xanthoriza* und *Curcuma domestica*, und hat sich bisher in Tierversuchen als eine stark wirksame chemopräparative Substanz im Sinne einer tumorhemmenden Wirkung erwiesen, wobei praktisch keine toxischen Wirkungen zu beobachten waren. Curcumin weist darüber hinaus auch eine stark entzündungshemmende Wirkung auf. Schließlich zeigten Curcumin-Analoga in Zellkulturen eine gute inhibitorische Wirkung hinsichtlich der Integrase von HIV (Mazumder et al., J. Med. Chem. 40, S. 3057-3063). Sie können somit die Integration von HIV-DNA nach reverser Transkription in das Wirtsgenom verhindern. Diese Integration ist die Voraussetzung für effiziente Replikation dieser Viren in den Wirtszellen, die bei HIV mit der Krankheitsprognose assoziiert ist. Eine Hemmung der Integrase mittels Curcumin bzw. Curcumin-Analogen kann somit als wichtige therapeutische Maßnahme zur Bekämpfung einer HIV-Infektion angesehen werden. Für Curcumin selbst konnten ähnlich gute Resultate, wie sie bisher im Tiermodell gewonnen wurden, beim Menschen in klinischen Phase I- und Phase-II-Studien nicht erzielt werden, wobei davon ausgegangen werden kann, daß dies darauf beruht, daß der Wirkstoff nicht

in ausreichender Konzentration am Wirkort vorliegt. Daten aus einer klinischen Phase-I-Studie in Taiwan zeigen, daß bei einer Verabreichung von 4 g/Tag Curcumin Serumkonzentrationen von lediglich $0,41 \mu\text{M}$, bei 6 g/Tag $0,57 \mu\text{M}$ und bei 8 g/Tag $1,75 \mu\text{M}$ erreicht wurden, d.h. nur ein geringer Teils des Curcumins wird in die Zirkulation abgegeben und der größere Teil wird ungenutzt ausgeschieden. In dieser Studie wurde Curcumin in Form von Lutschtabletten zu je 100 mg bzw. 1 g Wirkstoff in einer morgendlichen Dosis bis zu 8 g über einen Zeitraum von mehreren Monaten verabreicht. Es ist wahrscheinlich, daß bei den gemessenen geringen Serumkonzentrationen keine Wirkung erreicht werden konnte, da die in der Literatur beschriebenen verschiedenen chemopräventiven Wirkungen von Curcumin in Zellkulturen erst bei Konzentrationen von mindestens $10 \mu\text{M}$ im Medium auftraten. Schließlich weist die in der Taiwan-Studie eingeschlagene Vorgehensweise noch einen weiteren gravierenden Nachteil auf. Um eine einigermaßen gute Aufnahme des Curcumins im Mund- und Halsbereich überhaupt erzielen zu können, sollten die Patienten die Curcumintabletten im Mund zergehen lassen. Da bei dem in der Taiwan-Studie verwendeten Tablettentyp jede einzelne Tablette mindestens 15 min zur Auflösung brauchte, müßten die Patienten monatlang über längere Zeit des Tages jeweils eine Tablette im Mund zergehen lassen. Es scheint zumindest fragwürdig, ob die Patienten die notwendige Compliance dafür aufbringen.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Curcumin, Curcumin-Derivate oder Curcumin-Analoga in einer solchen Form bereitzustellen, daß nach Verabreichung höhere Plasmakonzentrationen und somit therapeutisch wirksame Konzentrationen erreicht werden können. Dadurch sollte auch die therapeutisch notwendige Tagesdosis verringert werden können, was zu einer Erhöhung der Bereitschaft des Patienten führen sollte, die Therapie vollständig durchzuführen.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

In der vorliegenden Erfindung wurde davon ausgegangen, daß die geringe Aktivität von oral zugeführtem Curcumin beim Menschen eine Folge der geringen Löslichkeit von Curcumin ist, die dann zu den geringen Konzentrationen im Serum führt. Daher wurden Curcumin-Derivate entwickelt, die eine höhere Löslichkeit dadurch aufweisen, daß sie mit Saccharid-Resten verknüpft sind. Diese Curcumin-Derivate können somit beispielsweise als "Prodrugs" durch orale Verabreichung, Injektion oder Infusion zugeführt werden und sollten die Erzielung von Plasmaspiegeln erlauben, bei denen ein therapeutischer Effekt erreichbar ist. Dieses Vorgehen ist auch deshalb vorteilhaft, weil dabei die Diketonstruktur nicht zerstört wird; für die Wirkung von Curcumin ist offenbar diese Struktur erforderlich. Das erfindungsgemäß derivatisierte Curcumin weist nicht nur eine höhere Löslichkeit auf, sondern es kann auch davon ausgegangen werden, daß es deshalb besser von den Zellen aufgenommen wird, weil dafür spezifische Transportsysteme auf der Zelloberfläche zur Verfügung stehen (Veyl et al., PNAS 95, S. 2914-2919 (1998)). Erfindungsgemäße Verbindungen reichern sich deshalb bevorzugt in Zellen, Organen und Geweben an, die Glucosetransporter und/oder verwandte Transporter aufweisen. Die Konjugate sollten sich insbesondere in Leber, Niere, Herz, Thymus, Schilddrüse, Darm und Gehirn sowie in allen Arten von Tumoren anreichern. Durch die Saccharidstrukturen läßt sich auch ein gezieltes Ansteuern (Targeting) von bestimmten Tumorzellen erzielen. So sollten die Curcumin-Derivate vor allem von (prä-)malignen Zellen mit Expression des Glucose-Cotransporters SAAT1 oder ähnlicher Co-Transporter besser aufgenommen werden.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Curcumin-Derivat mit gegenüber Curcumin verbesserter Wasserlöslichkeit, dadurch gekennzeichnet, daß der Curcumin-Anteil mit einem Saccharid verknüpft ist. Dies geschieht vorzugsweise über eine glykosidische Bindung.

Der hier verwendete Ausdruck "Curcumin" betrifft sowohl Curcumin als auch Curcumin-ähnliche Verbindungen mit

vergleichbarer Aktivität und Analoge davon, die über eine im wesentlichen gleiche Löslichkeit verfügen. Hierzu zählen beispielsweise Dicaffeoylmethan, Rosmarinsäure, Arylamide von Curcumin sowie die Verbindungen NSC 158393 und NSC 117027 (Mazumder et al., J. Med. Chem. 1996, 39: 2472-2481).

Die Verknüpfung des Curcumins bzw. seiner Analoge oder Derivate mit dem Saccharid kann mittels dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen, beispielsweise über die in dem nachstehenden Beispiel beschriebene Königs-Knorr-Reaktion oder über das bekannte Imidat-Verfahren. Zu weiteren geeigneten Verfahren zählt ein Verfahren analog Artico et al. (J. Med. Chem. 41, S. 2984-3960, (1998)), bei dem erfindungsgemäß die Curcumin-Derivate durch Kondensation äquimolarer Mischungen von beispielsweise 4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd-4-saccharid und 4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd mit Acetylacetone unter Borsäurekatalyse und nachfolgender chromatographischer Abtrennung der gewünschten Mono- oder Disaccharide erhalten werden. Ein alternativer Syntheseweg ist die Herstellung von Saccharidderivaten durch eine "umgekehrte Spaltung" bei der das Reaktionsgleichgewicht der β -Glycosidase-Spaltung durch geeignete Maßnahmen nach links verschoben wird (Menzler et al., 1997, Biotechnology Letters 11 (2), S. 269-272).

Die biologische Wirksamkeit der so erhaltenen Curcumin-Derivate kann anhand der bekannten biologischen Eigenschaften überprüft werden, beispielsweise kann die Curcumin-artige antioxidative Wirkung geprüft werden oder die Hemmung der Transkription zahlreicher viralen und zellulärer Gene, die von AP-1- und NF-kappaB-Stellen enthaltenden Promotoren gesteuert wird.

Der hier verwendete Ausdruck "gegenüber Curcumin verbesserte Wasserlöslichkeit" bezieht sich auf eine solche Wasserlöslichkeit, daß bei oraler Verabreichung, bei Injektion oder bei kontinuierlicher Zuführung, beispielsweise für eine gewünschte Krebs-Prävention (u.U. auch eine Krebs-Chemotherapie), entzündungshemmende oder virushemmende

Wirkung, eine ausreichend hohe Konzentration des Wirkstoffs im Serum erreicht werden kann. Vorzugsweise liegt die zu erzielende Serumkonzentration im Bereich von mindestens 5-10 μM . Ganz bevorzugt ist ein Bereich von 10-30 μM .

Der Begriff "Saccharid" umfaßt Saccharide jeglicher Art, insbesondere Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharide (z.B. mono-, di- tri-, multi-antennäre sowie dendritische Saccharide) in allen stereoisomeren und enantiomeren Formen. Diese können Pentosen oder Hexosen sein. Als Monosaccharide sind insbesondere Glucose, ganz besonders α - und β -D-Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, Digitoxose und Derivate davon bevorzugt. Als Disaccharide eignen sich insbesondere Saccharose, Maltose, Laktose oder Gentobiose, entweder 1,4- oder 1,6-verknüpft, sowie Derivate davon. Als Saccharide gelten hier auch Inosite und Derivate davon, ganz besonders cis-Inositol, epi-Inositol, allo-Inositol, myo-Inositol, muco-Inositol, chiro-Inositol, neo-Inositol, scyllo-Inositol, Pinpollitol, Streptamin, Quercitol, Chinasäure, Shikimisäure, Conduritol A bzw. B, Validatol und Quebrachitol, z.B. aus Galactinolen, sowohl aus pflanzlichen Quellen, wie Zuckerrüben, als auch aus Milchprodukten, oder durch enzymatische Enantiomerentrennung gewonnene Verbindungen. Ferner sind erfindungsgemäß einsetzbare Saccharide Glykokonjugate. Diese können Konjugate von z.B. Sacchariden mit Peptiden, Lipiden, Säuren (=> Ester), Alkylresten (=> Ether), Heterozyklen oder anderen Kohlenhydraten sein. Ein Beispiel von Glykokonjugaten ist Z1-Z10, ein Gemisch von 10 Glykokonjugaten. Bei den Verbindungen Z1-Z10 handelt es sich um in der Natur vorkommende Glycopeptide, Glycoproteine und Lipopolysaccharide. Derivate der erwähnten Saccharide sind z.B. mit Schutzgruppen, wie Benzyl-, geschützte Saccharide und/oder mit funktionellen Gruppe, wie Aminogruppen, Phosphatgruppen oder Halogenidgruppen, modifizierte Saccharide. Unter Sacchariden werden erfindungsgemäß auch ganze Saccharid-Bibliotheken, wie sie beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung DE 196 42 751.7 beschrieben sind, verstanden. Vorstehende Saccharide

können natürlich vorkommen oder synthetisch hergestellt sein. Vorzugsweise weist ein erfindungsgemäßes Konjugat nur ein Saccharid auf, aber auch eine Anzahl von 2, 3, 4, 5 und 6 Saccharid-Komponenten ist denkbar. Die Saccharide können dabei gleich oder verschieden voneinander sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Konjugate ist ein Saccharid mit der Curcumin-Komponente über einen Linker verbunden. Als Linker eignen sich besonders kurzkettige Diole von 1,2-Diol (z.B. Ethylenglykol) bis 1,6-Hexandiol. Weiter sind Ätherbrücken und Dicarbonsäure-Linker einsetzbar.

Die Derivatisierung wird vorzugsweise so durchgeführt, daß durch spontane oder enzymatisch unterstützte Hydrolyse die Wirksubstanz (Curcumin, Curcumin-ähnliche Verbindungen oder Analoge) in der Zielzelle wieder freigesetzt wird. Dies kann beispielsweise durch extra- oder intrazelluläre β -Glucosidase(n) erfolgen, die ein breites Wirkungsspektrum gegenüber Glykosidderivaten zeigen und in menschlicher Leber und Dünndarm in den relativ höchsten Konzentrationen gegenüber anderen menschlichen Organen vorliegt. Somit sind in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfung mit dem Mono-, Oligo- oder Polysaccharid so erfolgt, daß durch spontane, säure- oder enzym-katalysierte Hydrolyse aufgrund der säurelabilen Zuckerbindung an der phenolischen OH-Gruppe in der Zielzelle die Wirksubstanz Curcumin wiederhergestellt wird, wobei die Spaltbarkeit vorher *in vitro* geprüft werden kann. Besonders bevorzugt sind Curcumin-Derivate, bei denen die Verknüpfung eine O-glykosidische Bindung ist. Vorteilhafterweise erfolgt die Bindung an der 1- oder 4- Position des Saccharids, wobei die 1-Position wegen der besseren Abspaltbarkeit bevorzugt ist.

In der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Curcumin-Derivat das Curcumin-4-Monoglykosid oder Curcumin-4,4'-Diglykosid bzw. das entsprechende

Galactosid.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Arzneimittel, das ein erfindungsgemäßes Curcumin-Derivat enthält, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphatgepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann in Form einer Injektionslösung, Tablette, Salbe, Suspension, Emulsion, eines Zäpfchens etc. vorliegen. Es kann auch in Form von Depots (Mikrokapseln, Zinksalze, Liposomen etc.) verabreicht werden. Die Art der Verabreichung des Arzneimittels hängt unter anderen davon ab, in welcher Form der Wirkstoff vorliegt, sie kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intra-tumorale (z.B. direkt zu einem Karzinom), intramuskuläre, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale, transdermale oder transmukosale (nasal, vaginal, rektal, sublingual) Verabreichung. Die Verabreichung kann auch durch Mikroinjektion erfolgen. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, der Art und dem Stadium der Erkrankung, der Art der Verabreichung etc.

Die erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate können zusammen mit Glycosidasen (z.B. Cerebrosidase) verabreicht werden, was die Freisetzung des Curcumins unabhängig von im Körper bereits vorhandenen Glycosidasen macht. Die beiden Komponenten können in Liposomen verpackt und verabreicht werden.

Da die tumorhemmende Wirkung von Curcumin im Tierexperiment bereits gezeigt werden konnte, bisher jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit von Curcumin beim Menschen deutlich

geringer war, kann davon ausgegangen werden, daß mit den erfindungsgemäßen Curcumin-Derivaten aufgrund der deutlich verbesserten Aufnahme und den dadurch erzielten wesentlich erhöhten Plasmaspiegeln eine krebshemmende Wirkung erreicht werden kann. Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Curcumin-Derivats zur Prävention oder Behandlung von Krebs. Eine Hemmung der Epstein-Barr-Virus-Reaktivierung in B-lymphoiden Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden. Aufgrund der stark verbesserten Löslichkeit der erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate kann davon ausgegangen werden, daß die erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate somit auch zur Prävention oder Behandlung von EBV-assoziierten Tumoren, beispielsweise des Nasopharynx-Karzinoms; EBV-haltigen Hodgkin-Lymphomen und -Nicht-Hodgkin-Lymphomen, -T-Zell Lymphomen, -Magencarcinomen, EBV-assoziierte HCV-Hepatitis, EBV-assoziierten Tumoren der weiblichen Brust und Transplantations-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) geeignet sind. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate zur Prävention oder Behandlung von EBV-assoziierten Tumoren und Transplantations-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen. Dasselbe gilt auch für andere Viren, wie Hepatitis-B-Viren und humane Papillomviren, bei denen wichtige Gene über Protein-Kinase C-, NF-kappa B, Jun-Kinasen und AP1-Stellen geregelt werden, sowie die mit diesen Viren assoziierten Erkrankungen und Tumoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung der erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen. Hier kommt es auf den antioxidativen Effekt von Curcumin bzw. -Derivaten gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies aus Entzündungszellen an.

Da bereits gezeigt werden konnte, daß Curcumin-Analoge in Zellkulturen eine hemmende Wirkung auf die Integrase beispielsweise von HIV ausüben, kann davon ausgegangen werden, daß mit den erfindungsgemäßen Curcumin-Derivaten aufgrund der verbesserten Eigenschaften eine wirkungsvolle antivirale

Therapie am Menschen erreicht werden kann. Somit betrifft die vorliegende Erfindung schließlich die Verwendung der erfindungsgemäßen Curcumin-Derivate zur Behandlung von mit einer Retrovirus-Infektion, vorzugsweise von mit einer HIV-Infektion einhergehenden Erkrankungen.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Schematische Darstellung der Synthese des Curcuminmonoglykosids

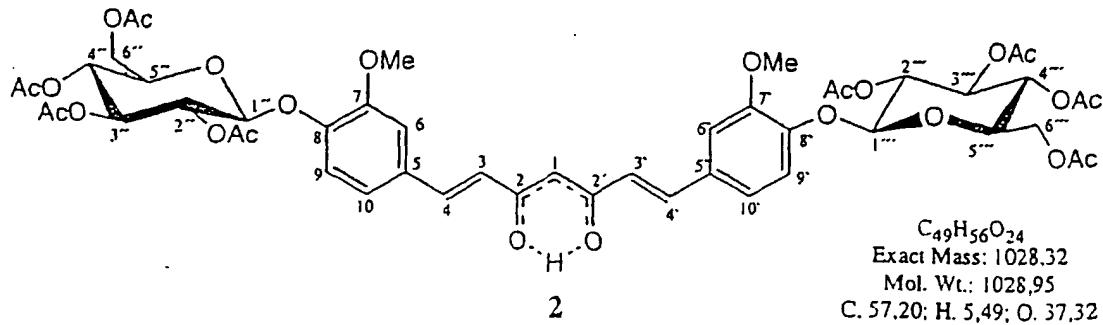
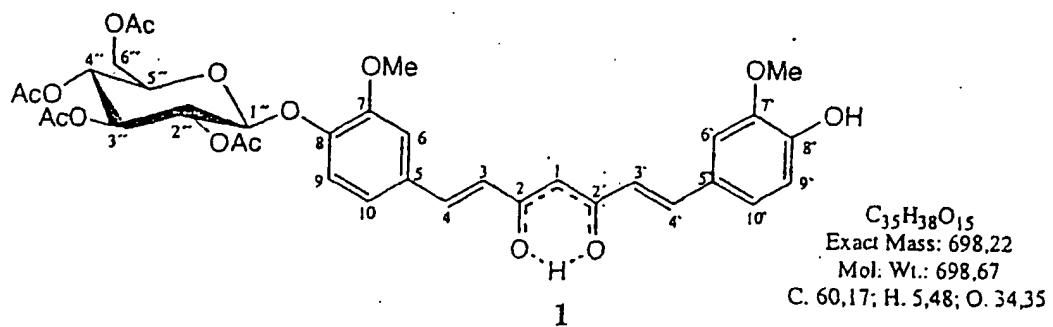
Figur 2: Schematische Darstellung der Synthese des Curcumindiglykosids

Figur 3: Hemmung des "Oxygen Burst" von Granulozyten

Figur 4: Hemmung der EBV-Induktion in Raji-DR-Luc Zellen

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung von 8-(2'', 3'', 4'', 6''-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-curcumin (1) und 8-(2'', 3'', 4'', 6''-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-8'-(2''', 3''', 4''', 6''''-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-curcumin (2)



Ein Gemisch aus 0,87 g (3,2 mmol) Benzyltriethylammoniumbromid, 8,25 ml 1,25 M Natronlauge, 16 ml Dichlormethan, 1,64 g (4 mmol) α -D-Acetobromglucose und 2,9 g (8 mmol) Curcumin wurde bei 60° für 12 h intensiv gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die organische Phase abgetrennt, zweimal mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-lösung ausgeschüttelt und zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und i. Vak. eingeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Petrolether/Essigsäureethylester 1,1:1 zur Elution des Monoglucosides, Petrolether/Essigsäureethylester 5:8 zur Elution des Diglucosides)

Ausbeute: 0,395 g (14 % d.Th.): Monoglucosid 0,461 g (11 % d.Th.): Diglucosid 2

Analytische Daten von 1:

NMR:

δ_H (250 MHz, CDCl₃, 30°C, TMS): 2.04 (s, 6H, COCH₃), 2.08 (s, 6H, COCH₃), 3.80 (ddd, 1H, J_{4'',5''} 9.8, J_{5'',6a''} 2.5, J_{5'',6b''} 4.9, 5''-H), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 4.18 (dd, 1H, J_{5'',6a''} 2.5, J_{6a'',6b''} 12.3, 6a''-H), 4.29 (dd, 1H, J_{5'',6b''} 4.9, J_{6a'',6b''} 12.3, 6b''-H), 5.01-5.31 (m, 4H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 5.81 (s, 1H, 1-H), 5.92 (bs, 1H, OH), 6.48 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.9, CHCHCO), 6.51 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.9, CHCHCO), 6.91-7.14 (m, 6H, 6-H, 9-H, 10-H, 6'-H, 9'-H, 10'-H), 7.57 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.9, CHCHCO), 7.60 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.9, CHCHCO)

δ_{C} (63 MHz, CDCl₃, 30°C): 20.57, 20.60, 20.67 (COCH₃), 55.96, 56.12 (7-OCH₃, 7'-OCH₃), 61.93 (6''-C), 68.38, 71.17, 72.12, 72.54 (2''-C, 3''-C, 4''-C, 5''-C), 100.32, 101.37, 109.71, 111.68, 114.87, 119.64, 121.51, 121.75, 122.96, 123.50 (1-C, 1''-C, 3-C, 3'-C, 6-C, 6'-C, 9-C, 9'-C, 10-C, 10'-C), 127.58, 131.69 (5-C, 5'-C), 139.52, 140.97 (4-C, 4'-C), 146.83, 147.63, 148.00, 150.79 (7-C, 7'-C, 8-C, 8'-C), 169.29, 169.38, 170.23, 170.54 (COCH₃), 182.22, 184.13 (2-C, 2'-C)

Massenspektroskopie:

pos. ESI-MS (MeOH/CHCl₃ 2:1): m/z (%): 699.1 [M+H]⁺ (16), 721.1 [M+Na]⁺ (100), 1419.6 [2M+Na]⁺

neg. ESI-MS (MeOH/CHCl₃ 2:1): m/z (%): 697.1 [M-H]⁻ (100), 733.0 [M+Cl]⁻ (8)

DC:

Kieselgel, Petrolether/ Essigsäureethylester (1,1:1) R_f = 0,20

Analytische Daten von 2:

NMR:

δ_{H} (250 MHz, CDCl₃, 30°C, TMS): 2.04 (s, 12H, COCH₃), 2.08 (s, 12H, COCH₃), 3.81 (ddd, 2H, J_{4'',5''} 9.8, J_{5'',6a''} 2.5, J_{5'',6b''} 5.0, J_{4'',5''} 9.8, J_{5'',6a''} 2.5, J_{5'',6b''} 5.0, 5''-H, 5'''-H), 3.87 (s, 6H, 7-OCH₃, 7'-OCH₃), 4.18 (dd, 2H, J_{5'',6a''} 2.5, J_{5'',6b''} 5.0, J_{6a'',6b''} 12.2, J_{5'',6a''} 2.5, J_{5'',6b''} 5.0, J_{6a'',6b''} 12.2, 6a''-H, 6a'''-H), 4.29 (dd, 2H, J_{5'',6b''} 5.0, J_{6a'',6b''} 12.2, J_{5'',6b''} 5.0, J_{6a'',6b''} 12.2, 6b''-H, 6b'''-H), 5.01-5.31 (m, 8H, 1''-H, 1'''-H, 2''-H, 2'''-H, 3''-H, 3'''-H, 4''-H, 4'''-H), 5.84 (s, 1H, 1-H), 6.52 (d, 2H, J_{3,3'} 16.0, 3-H, 3'-H), 7.08-7.14 (m, 6H, 6-H, 9-H, 10-H, 6'-H, 9'-H, 10'-H), 7.59 (d, 2H, J_{4,4'} 16.0, 4-H, 4'-H)

δ_{C} (63 MHz, CDCl₃, 30°C): 20.54, 20.58, 20.66 (COCH₃), 56.12 (7-OCH₃, 7'-OCH₃), 61.90 (6''-C, 6'''-C), 68.35, 71.15, 72.10, 72.50 (2''-C, 2'''-C, 3''-C, 3'''-C, 4''-C, 4'''-C, 5''-C, 5'''-C), 100.27, 101.56 (1-C, 1''-C, 1'''-C), 111.70, 119.61, 121.59, 123.45 (3-C, 3'-C, 6-C, 6'-C, 9-C, 9'-C, 10-C, 10'-C), 131.55 (5-C, 5'-C), 139.96 (4-C, 4'-C), 147.72, 150.78 (7-C, 7'-C, 8-C, 8'-C), 169.26, 169.36, 170.21, 170.51 (COCH₃), 183.10 (2C, 2'-C)

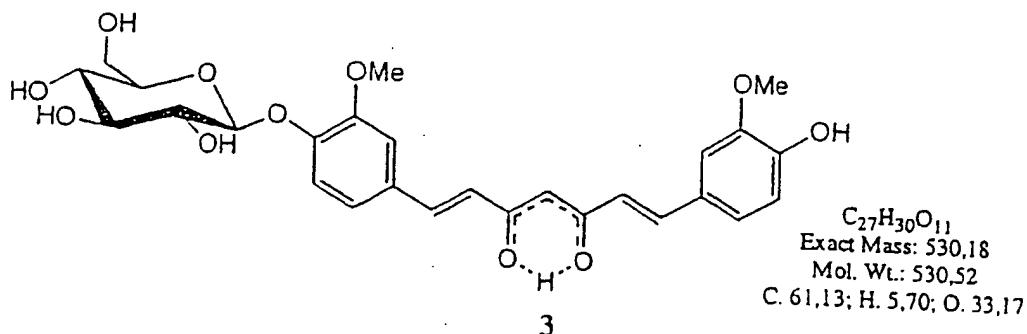
Massenspektroskopie:

pos. ESI-MS (MeOH/CHCl₃ 2:1): m/z (%): 1029.3 [M+H]⁺ (90), 1051.3 [M+Na]⁺ (12), 699.1 [Monoglucosid 1+H]⁺ (80), 2057.7 [2M+H]⁺

DC:

Kieselgel, Petrolether/ Essigsäureethylester (5:8) R_f = 0.22

Beispiel 2: Herstellung von 8-(β -D-Glucopyranosyl)curcumin (3)



0,375 g (0,51 mmol) acetylgeschütztes Curcuminglucosid 1 wurden in 40 ml Methanol aufgenommen, gerührt, mit 10 ml einer 0,1 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und 3 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wurde mit Ionenaustauscherharz Amberlite H⁺ 50 WX 2 neutralisiert, abfiltriert und i. Vak. eingeengt. Das Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch aufgetrennt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 9:1).

Ausbeute: 0,151 g (56 % d.Th.)

DC:

Kieselgel, Dichlormethan/Methanol (9:1) $R_f = 0,22$

Analytische Daten von 3:

NMR:

δ_H (250 MHz, CD₃OD, 30°C, TMS): 3.42-3.89 (m, 6H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6a''-H, 6b''-H), 3.89 (s, 6H, 7-OCH₃, 7'-OCH₃), 4.96 (d, 1H, J_{1'',2''} 7.4, 1''-H), 5.96 (s, 1H, 1-H), 6.60 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.8, CHCHCO), 6.65 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.8, CHCHCO), 6.79-7.23 (m, 6-H, 6'-H, 9-H, 9'-H, 10-H, 10'-H), 7.54 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.8, CHCHCO), 7.56 (d, 1H, J_{3,4} oder J_{3',4'} 15.8, CHCHCO)

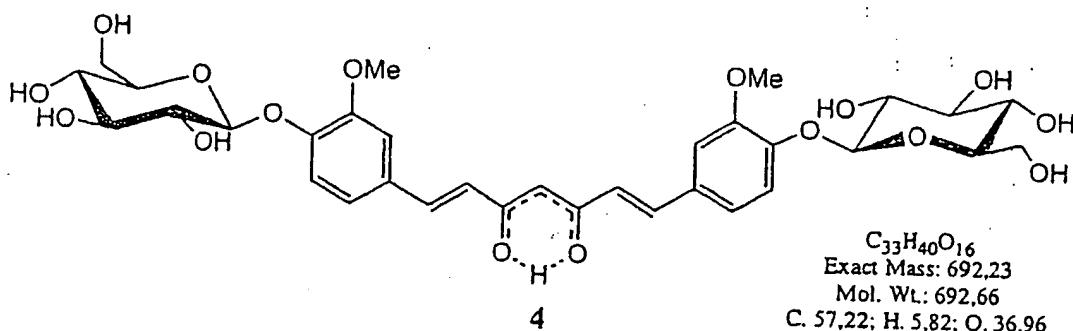
δ_C (63 MHz, CD₃OD, 30°C): 56.48, 56.79 (7-OCH₃, 7'-OCH₃), 62.52 (6''-C), 71.33, 74.85, 77.88, 78.31 (2''-C, 3''-C, 4''-C, 5''-C) 102.29 (1''-C) 111.84, 112.51 (6-C, 6'-C), 116.61, 117.52 (9-C, 9'-C), 122.33, 123.44, 123.87, 124.21 (3-C, 3'-C, 10-C, 10'-C), 128.53, 131.42 (5-C, 5'-C), 141.10, 142.51 (4-C, 4'-C), 149.43, 149.88, 150.57, 151.06 (7-C, 7'-C, 8-C, 8'-C), 183.71, 185.65 (2-C, 2'-C)

Massenspektroskopie:

pos. ESI-MS (MeOH): m/z (%): 530.6 [M+H]⁺ (4), 552.9 [M+Na]⁺ (100)
 neg. ESI-MS (MeOH): m/z (%): 528.9 [M-H]⁻ (100), 564.9 [M+Cl]⁻ (4)

m/z (pos. FAB, Nitrobenzylalkohol): gefunden 531,1896 [M+H]⁺, berechnet für C₂₇H₃₁O₁₁ 530,1857

Beispiel 3: Herstellung von 8,8'-Bis-(β -D-glucopyranosyl) curcumin (4)



0,381 g (0,37 mmol) acetylgeschütztes Curcuminglucosid 2 wurden in 40 ml Methanol aufgenommen, gerührt, mit 10 ml einer 0,1 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und 3 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wurde mit Ionenaustauscherharz Amberlite H⁺ 50 -wx 2 neutralisiert, abfiltriert und i. Vak. eingeengt. Das Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch aufgetrennt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol 4:1).

Ausbeute: 0,071 g (28 % d.Th.)

Analytische Daten von 4:

Massenspektroskopie:

pos. ESI-MS (MeOH/ H₂O 2:1): *m/z* (%): 693.1 [M+H]⁺ (4), 715.2 [M+Na]⁺ (72), 1408.2 [2M+Na]⁺ (8)

neg. ESI-MS (MeOH/ H₂O 2:1): *m/z* (%): 691.1 [M-H]⁻ (88), 727.1 [M+Cl]⁻ (92)

HR-FAB:

m/z (pos. FAB, Glycerin): gefunden 693,2408 [M+H]⁺, berechnet für C₃₃H₄₁O₁₆ 692,2382

DC:

Kieselgel, Dichlormethan/ Methanol (4:1) R_f = 0,20

Beispiel 4: Wasserlöslichkeit von Curcumin, Curcumin-mono- und -diglucosid

Curcumin und seine zwei Derivate (1) und (2) können mit Hilfe eines HPLC-Systems voneinander getrennt und quantifiziert werden.

HPLC-Bedingungen: Säule Lichrospher-100-RP18-5μ, 125x4 mm
Laufmittel/Gradient/Fluss
Acetonitril/Essigsäure 0.2 bzw. 2 %,
1 ml/min
Detektion: UV 420 nm

Mit den einzelnen Verbindungen wurde jeweils die zugehörige Eichgerade ermittelt. Zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Curcumin und seiner beiden Derivate wurden gesättigte Lösungen bei R.T. in Argon-gesättigtem Wasser hergestellt. Der Gehalt von je 20 μl der gesättigten Lösungen wurde mittels HPLC bestimmt.

Zunächst wurden folgende Werte für die Löslichkeit erhalten:

Curcumin: 4 +/- 0.3 mg/Liter

Curcumin-monoglucosid	13,2 +/- 0.9
Curcumin-diglucosid	> 10700

Daraus ergibt sich eine erhöhte Wasserlöslichkeit der beiden Derivate, vor allem das Diglucosids, bei dem eine gesättigte Lösung mit der verwendeten Menge gar nicht zu erhalten war.

Beispiel 5: Aufnahme von Curcumin und seinen Derivaten (1) und (2) in Raji-Zellen

Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt, da Curcumin und seine beiden Derivate Fluoreszenz zeigen.

Aus Vorversuchen war bekannt, dass Curcumin nach 2-3 Std. maximale Aufnahme in Raji-Zellen zeigt. Raji-Zellen wurden daher jeweils 3 Std. lang mit je 15 μM Curcumin bzw. Derivaten inkubiert.

Aliquots der Zellen in Medium wurden auf Poly-L-lysinbeschichtete Objektträger (zur Anhaftung der Zellen) pipettiert; nach 30 Minuten wurden die Zellen mit einem Deckglas abgedeckt und durch einen geeigneten Filter mit UV-Licht angeregt. Die Fluoreszenz repräsentativer Zellen wurde mit Imageanalyse gemessen; die sehr helle Fluoreszenz des zell-assoziierten Curcumins zeigte, dass vor allem diese Verbindung von den Zellen aufgenommen wird, doch fluoreszierten auch die mit Curcumin-monoglucosid behandelten Zellen um den Faktor 10-100 schwächer, während die mit Curcumin-diglucosid behandelten Zellen gerade noch sichtbar waren.

Dies weist auf eine Aufnahme entweder der unveränderten Verbindungen oder ihres Hydrolyseproduktes Curcumin in B-lymphoide Zellen im Sinne dieser Patentanmeldung hin.

Beispiel 6: Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von Curcumin und seinen Derivaten (1) und (2)

Diese Untersuchungen wurde mit Hilfe der Hemmung des "Oxygen burst" von Granulozyten (PMN) aus menschlichem Blut nach Hergenhahn et al. (1991) J.Cancer Res.Clin.Oncol. 117, 385-395 und Bouvier, Hergenhahn et al. (1993) Carcinogenesis 14, 1573-8, durchgeführt. Die Granulozytenfraktion aus heparinisiertem Blut wird durch Agglutination der Erythrozyten mit 2.5 % Dextran in PBS (30 min bei RT) angereichert, durch Lyse von restlichen Erythrozyten befreit und nach Waschung mit PBS in den Test eingesetzt. In einem Gesamtvolume von 1 ml werden je 100.000 Granulozyten mit Luminol bzw. Lucigenin versetzt und im Chemilumineszenz (CL)-Messgerät Biolumat LB 953 (EG&G Berthold, Wildbad) auf 37°C gebracht; die Zellen werden dann mit TPA bei einer Endkonzentration von 100 nM stimuliert. Die CL-Kurven werden über eine Stunde verfolgt; als Mass für die Chemilumineszenz wird das Integral unter der Kurve verwendet. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 gezeigt.

Bei Verwendung von Hemmstoffen ergibt sich ein konzentrationsabhängiger Hemmeffekt, der sich als später Anstieg, geringere Amplitude des Maximums und z.T. als früherer Abfall des Peaks erkennbar macht.

Auf diese Weise wurde ein starker antioxidativer Effekt in der Reihe Curcumin >> Curcumin-monoglucosid ~ Curcumin-diglucosid ermittelt.

Daraus kann abgeleitet werden, dass Curcumin und seine Derivate auch antiinflammatorisch aktiv sind, da sie konzentrationsabhängig wesentliche "reaktive Sauerstoff-Spezies" von Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen unterdrücken.

Beispiel 7: Untersuchungen zur Hemmwirkung auf die Reaktivierung von Epstein-Barr-Virus in Raji-Zellen

Die gegenwärtigen Untersuchungen wurden mit Raji-DR-LUC-Zellen durchgeführt. Dazu werden 50.000 Raji-DR-Zellen mit 10 nM TPA minus/plus Inhibitor (verschiedene Konzentrationen) in einem Volumen von 100 µl 72 Std. lang im CO₂-Inkubator behandelt. Nach Waschen mit PBS werden die Zellen lysiert; die Luciferase-Aktivität wird in Luciferase-Puffer (20 mM Tricine, 8 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 30 mM DTE, pH 7,8) mit Luciferin/CoA ATP als Substrat in einer jeweils gleichen Menge an Zelllysat bestimmt. Die induzierte Luciferase-Aktivität pro µg Protein wird im Vergleich zu einer Eichkurve mit authentischer Luciferase ermittelt. Hemmstoffe der EBV-Induktion führen zu geringerer Induktion von Luciferase im Vergleich mit der TPA-Kontrolle. Das Ergebnis ist in Fig. 4 gezeigt.

Der auf diese Weise ermittelte starke EBV-Hemmefekt nahm in der Reihe Curcumin > Curcumin-monoglucosid > Curcumin-diglucosid ab.

Curcumin selbst und aus Derivaten freigesetztes Curcumin hemmen die Transaktivierung wichtiger Gene, z.B. des Epstein-Barr-Virus, des Hepatitis B Virus, einiger humaner Papillomviren (z.B. HPV 16,18) und weiterer humanpathogener Viren, über sog. AP1-Sequenzen, über NF-kappa B (Familie)-Sequenzen und über bestimmte Signaltransduktionswege, z.B. PKC-, JNK-abhängige Wege; sie besitzen aber vermutlich noch weitere zelluläre Angriffspunkte, wie sich aus ihrer antioxidativen Wirkung ableiten lässt. Daraus kann geschlossen werden, dass sie bei Erreichen genügend hoher Konzentrationen in menschlichen Geweben die Reaktivierung von Epstein-Barr Virus und entzündliche Prozesse hemmen können. Unter denselben Bedingungen kann auch die Synthese und Wirkung wichtiger AP1-regulierter Proteine des Hepatitis B Virus und einiger Human Papillom Viren gehemmt werden.

Patentansprüche

1. Curcumin-Derivate mit gegenüber Curcumin verbesserter Wasserlöslichkeit, dadurch gekennzeichnet, daß der Curcumin-Anteil mit einem oder mehreren Saccharid-Anteilen verknüpft ist.
2. Curcumin-Derivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfung mit einem Mono-, Oligo- oder Polysaccharid erfolgt.
3. Curcumin-Derivate nach Anspruch 2, wobei die Verknüpfung mit dem Mono-, Oligo- oder Polysaccharid so erfolgt, daß durch spontane oder enzymatische Hydrolyse in der Zielzelle die Wirksubstanz Curcumin freigesetzt wird.
4. Curcumin-Derivate nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die Verknüpfung eine glykosidische Bindung ist oder mittels eines Linkers erfolgt.
5. Curcumin-Derivate nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei das Monosaccharid Glucose ist.
6. Curcumin-Derivate nach Anspruch 5, die Curcumin-4-Monoglykosid oder Curcumin-4,4'-Diglykosid sind.
7. Arzneimittel, Curcumin-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthaltend.
8. Verwendung des Curcumin-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Prävention oder Behandlung von Krebs.
9. Verwendung der Curcumin-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Prävention oder Behandlung von EBV-, HBV- oder HPV-assoziierten Tumoren oder Transplantations-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen.

10. Verwendung der Curcumin-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen.
11. Verwendung der Curcumin-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Behandlung von mit einer Retrovirus-Infektion einhergehenden Erkrankung.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Retrovirus-Infektion eine HIV-Infektion ist.

Synthese des Curcuminmonoglucosids

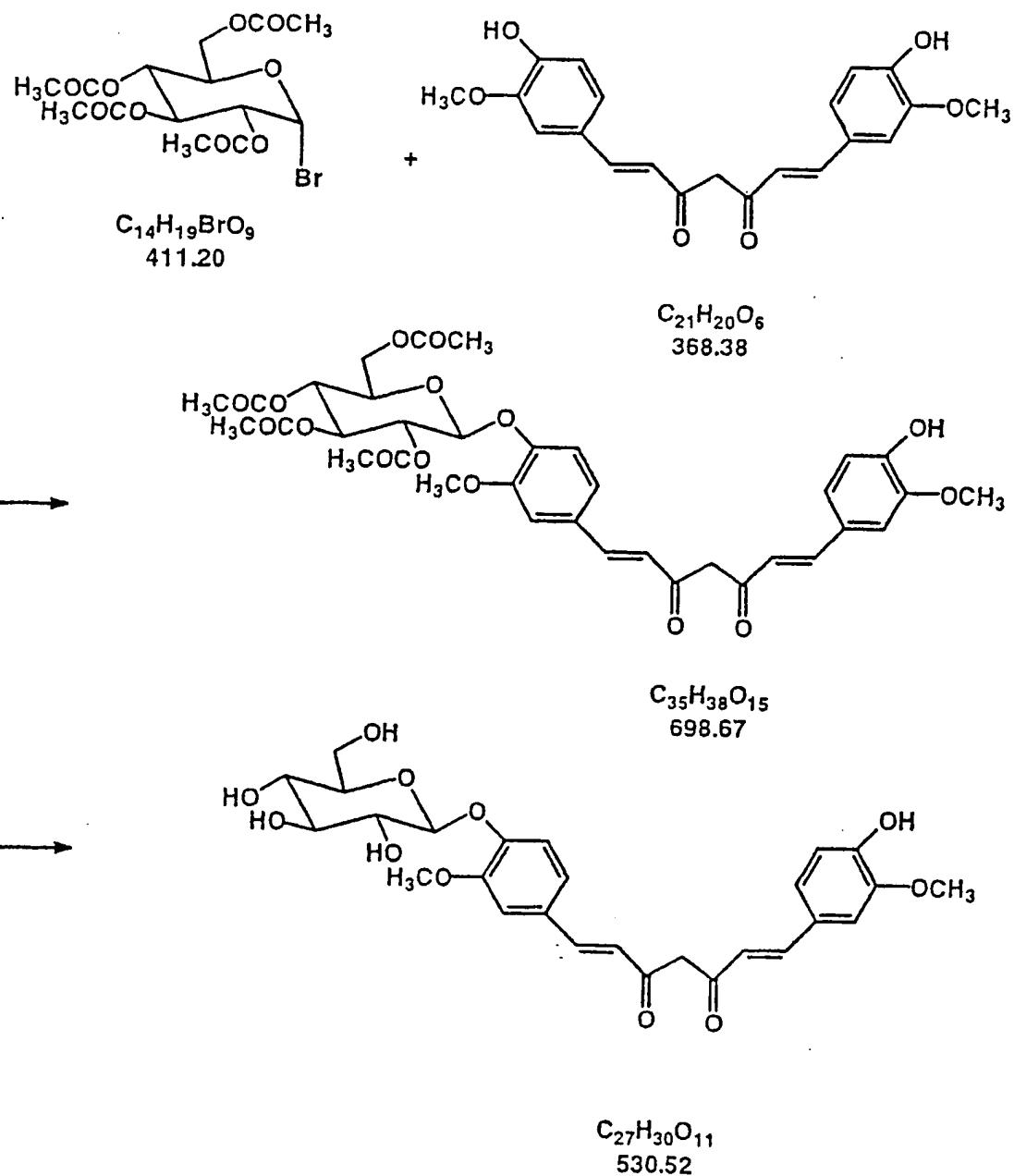


Fig. 1

2/4

Synthese des Curcumindiglucosids

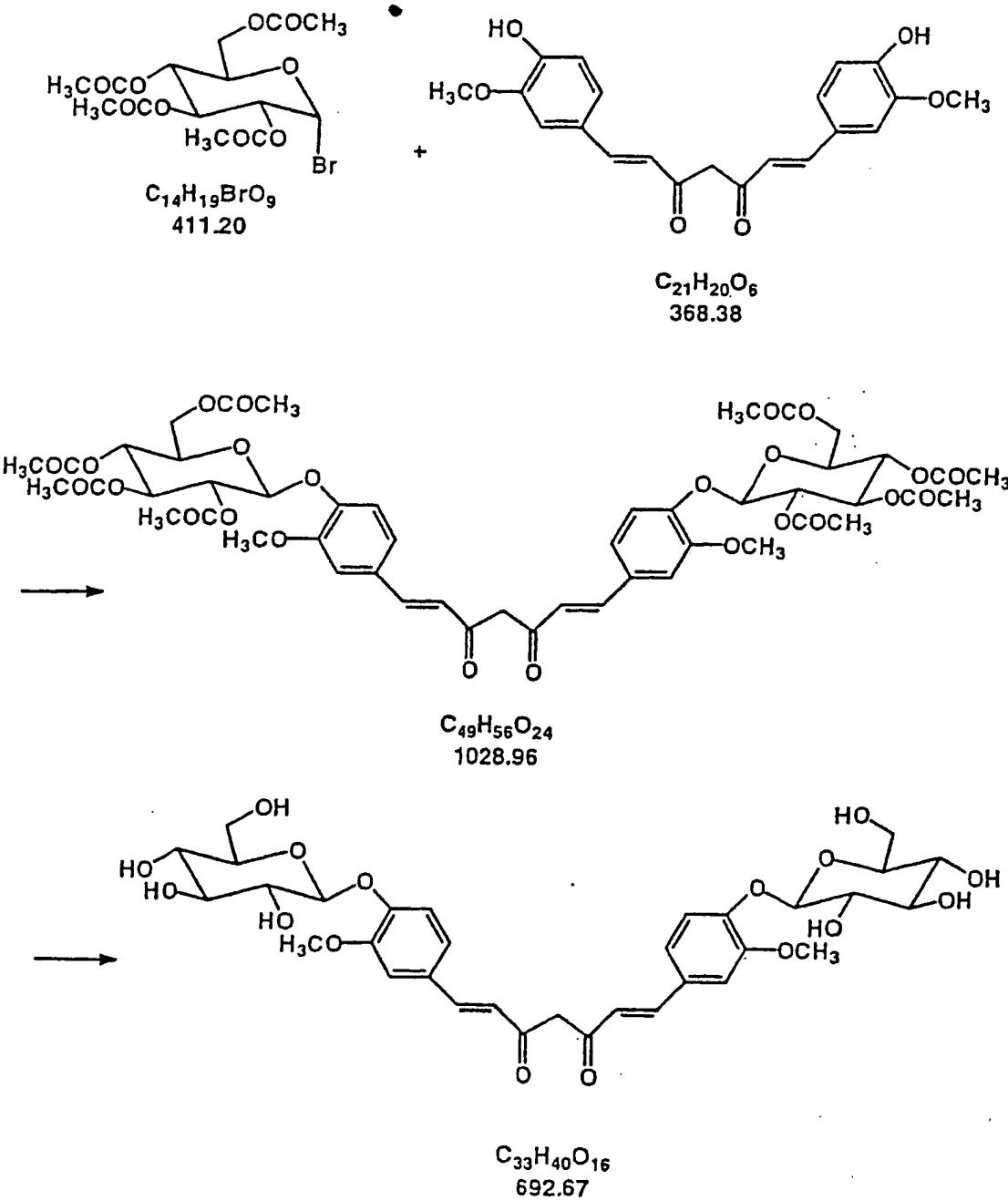


Fig. 2

Hemmung des 'Oxygen burst' von Granulozyten

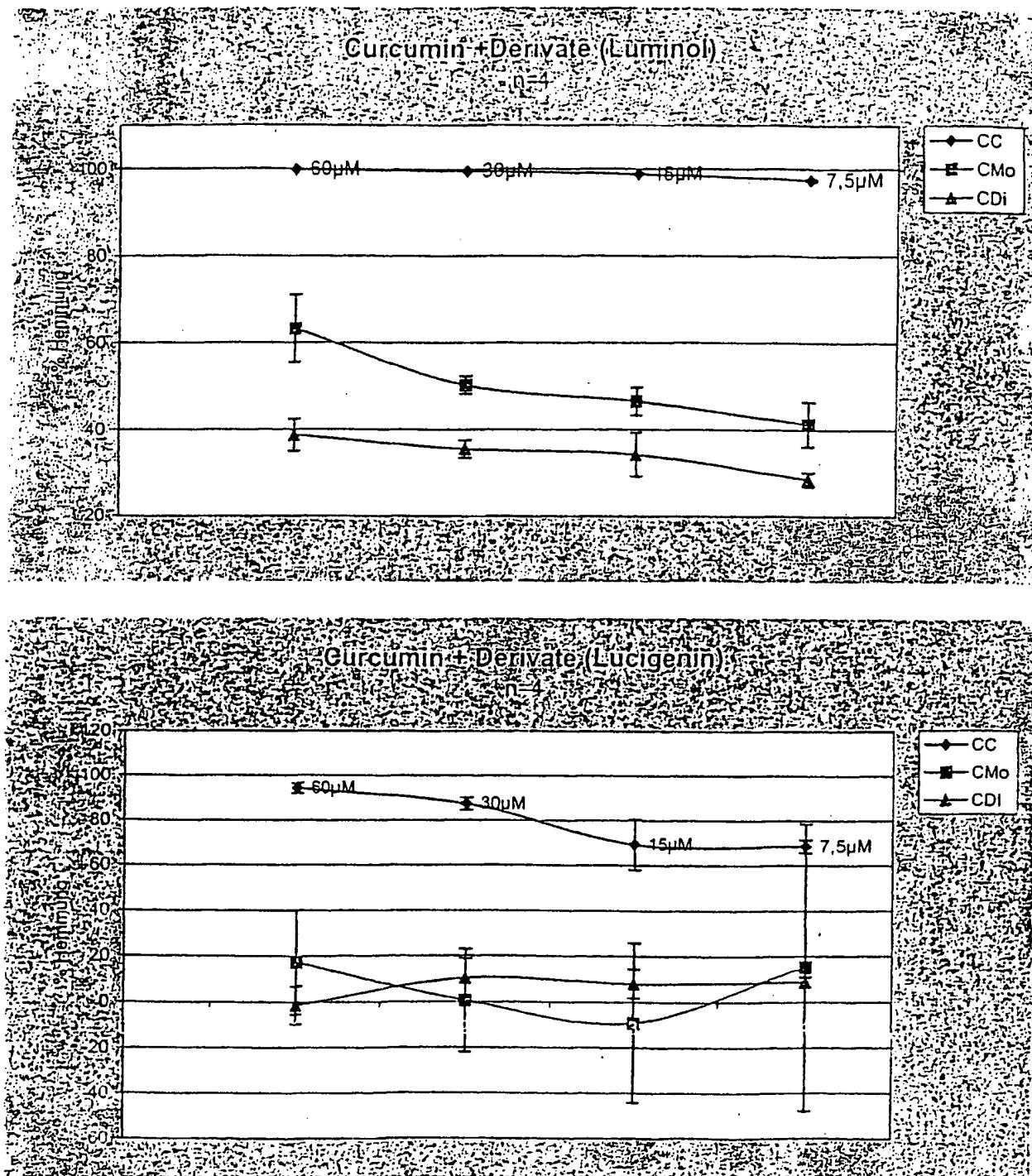
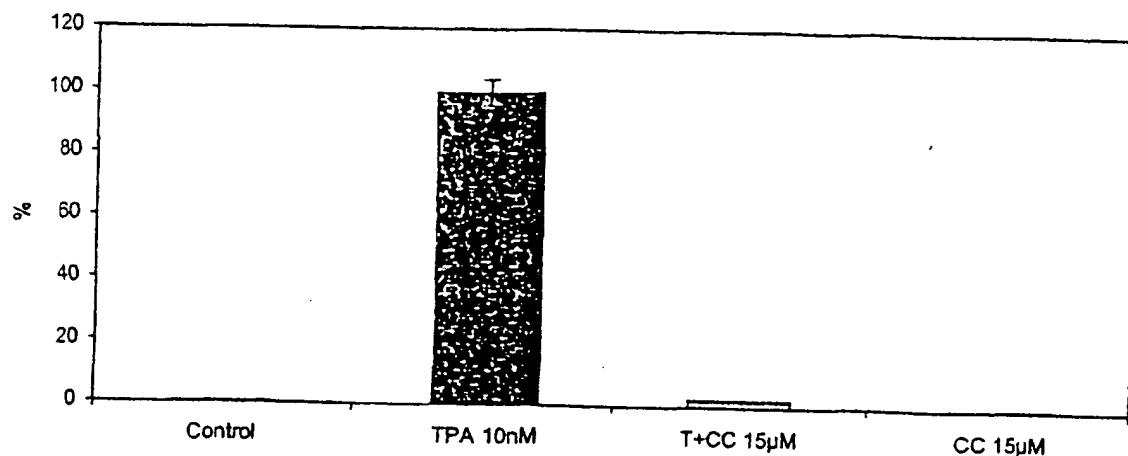
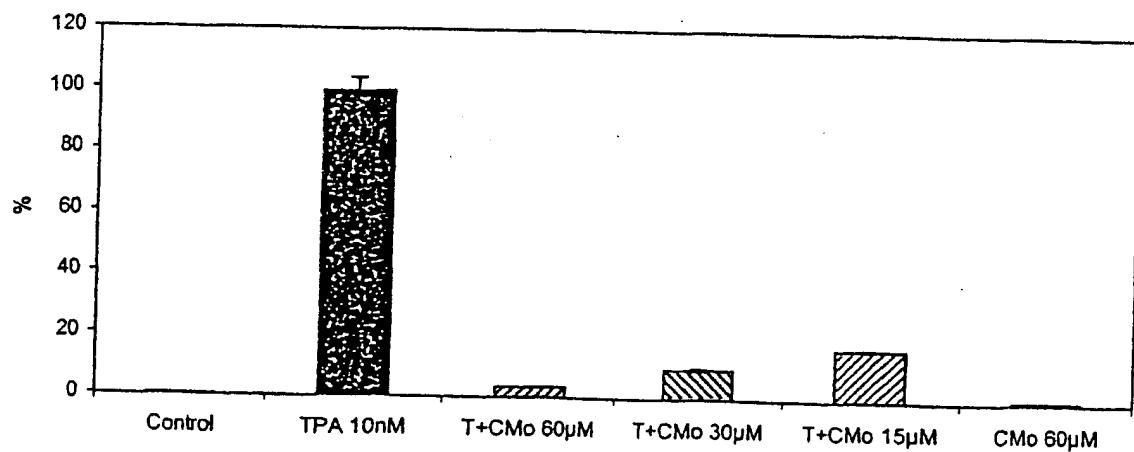
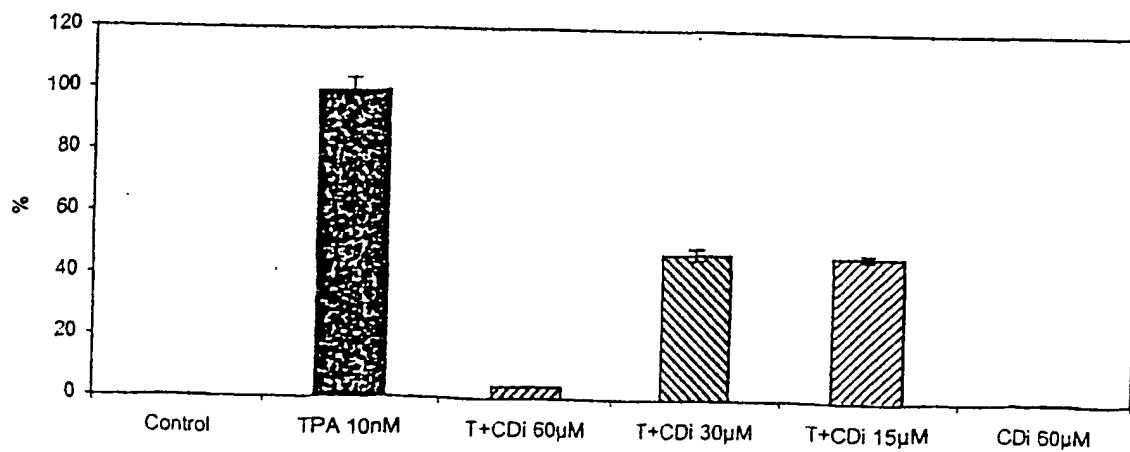


Fig. 3

Hemmung der EBV-Induktion in Raji-DR-LUC Zelle n

Curcumin (CC)

Curcumin- β -D-monoglucosid (CMo)Curcumin- β -D-diglucosid (CDi)

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H15/203 A61K31/7028 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07H A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M.-H. PAN ET AL.: "Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice" DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 27, no. 1, 1999, pages 486-494, XP001041393 Seite 486-487 Seite 491	1-4, 8
A	WO 95 18606 A (RES DEV FOUNDATION ;AGGARWAL BHARAT B (US)) 13 July 1995 (1995-07-13) the whole document	1, 8

 Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the international search report

22 November 2001

03/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/02337

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9518606	A 13-07-1995	AU	687509 B2	26-02-1998
		AU	1558595 A	01-08-1995
		CA	2180477 A1	13-07-1995
		EP	0738143 A1	23-10-1996
		JP	10500657 T	20-01-1998
		WO	9518606 A1	13-07-1995
		ZA	9500001 A	03-07-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/DE 01/02337

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07H15/203 A61K31/7028 A61P35/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07H A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	M.-H. PAN ET AL.: "Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice" DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, Bd. 27, Nr. 1, 1999, Seiten 486-494, XP001041393 Seite 486-487 Seite 491	1-4,8
A	WO 95 18606 A (RES DEV FOUNDATION ;AGGARWAL BHARAT B (US)) 13. Juli 1995 (1995-07-13) das ganze Dokument	1,8

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
22. November 2001	03/12/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter de Nooy, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02337

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9518606	A 13-07-1995	AU	687509 B2	26-02-1998
		AU	1558595 A	01-08-1995
		CA	2180477 A1	13-07-1995
		EP	0738143 A1	23-10-1996
		JP	10500657 T	20-01-1998
		WO	9518606 A1	13-07-1995
		ZA	9500001 A	03-07-1996